

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

**Untersuchungen über den Stoffwechsel
fetalen Gaumenfalten von Ratten und
den Einfluß von 6-Aminonicotinamid**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der ^{zahn} Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konrad Pielsticker
aus Kiel

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0027

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

**Untersuchungen über den Stoffwechsel
fetalen Gaumenfalten von Ratten und
den Einfluß von 6-Aminonicotinamid**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konrad Pielsticker
aus Kiel

Refferent: Prof. Dr. D. Neubert

Korrefferent: Prof. Dr. H.J. Merker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 28.2.1972

In Dank gewidmet

meinen Eltern

I n h a l t

1. Einleitung und Fragestellung

- a) Mechanismus des Gaumenschlusses
- b) Störungen des Gaumenschlusses
- c) Fragestellung dieser Arbeit

2. Methoden

- a) Versuchstiere
- b) Präparation der Gaumenfalten
- c) Einbaustudien mit ^{14}C -Glucose in-vitro
- d) Einbaustudien in-vivo
- e) Trennung säureunlöslicher Zellkomponenten mit einer modifizierten Ogur/Rosen-Schmidt/Tannhauser-Methode

3. Ergebnisse und Diskussion

- a) Fraktionierungsmethode zur Bestimmung des Einbaus radioaktiver Vorstufen in verschiedene Zellkomponenten
 - α) Trennung der RNA-Fraktion von sGG
 - β) Einbau verschiedener Vorstufen in Zellbestandteile von Rattenembryonen
- b) Untersuchungen über den Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in-vitro
- c) Untersuchungen über den Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in-vivo
- d) Untersuchungen über den Einbau von ^3H -Thymidin in-vivo
- e) Untersuchungen über den Stoffwechsel von Gaumenfalten nach Einwirkung von 6-Aminonicotinamid
 - α) Versuche über den Einbau von ^{14}C -Glucose in-vitro nach Gabe von 6-AN in-vivo
 - β) Einfluß von 6-AN auf die DNA-Synthese in den Gaumenfalten in-vivo

4. Zusammenfassung

1. Einleitung und Fragestellung

Unter den Fehlentwicklungen, die im Laufe der Foetalzeit auftreten können, spielen die Gaumenfalten eine besondere Rolle. Einmal ist diese Art der Mißbildung auch beim Menschen relativ häufig, und zum anderen ist - trotz intensiver Bemühungen - der Mechanismus, durch den diese Fehlentwicklung zustande kommt, noch recht unklar.

a. Mechanismus des Gaumenschlusses

Die endgültige Ausbildung des Gaumens erfolgt relativ spät während der Fetalentwicklung. Die verschiedenen Vorstadien dieses Prozesses erstrecken sich allerdings über einen relativ langen Zeitraum der Keimentwicklung.

Aus der primären Mundhöhle entsteht während der Fetalentwicklung die sekundäre Mundhöhle und die sekundäre Nasenhöhle. Bindegewebsstrukturen am Innenrand der primitiven Mundhöhle - die Gaumenfortsätze (Processus palatini) - wachsen von der Innenseite der Oberkieferfortsätze zunächst in Richtung auf den Unterkiefer vor. Die beiden Fortsätze richten sich dann auf, verschmelzen miteinander und trennen so die Mund- und die Nasenhöhle ab. Da sich aber zu der Zeit, an der die Gaumenfortsätze vorwachsen, am Boden der Mundhöhle die Zunge gebildet hat, die fast die ganze Mundhöhle ausfüllt, so liegen die Gaumenfortsätze anfänglich jederseits der Zungenanlage. Die Gaumenfortsätze jeder Seite wachsen oberhalb der Zungenanlage aufeinander zu. Sie können jedoch erst nach Senkung der Zunge miteinander verschmelzen.

Dieses Phänomen des Gaumenschlusses ist trotz jahrelanger Untersuchungen in den Einzelheiten noch relativ ungeklärt - der Mechanismus noch teilweise heftig umstritten. Für



Abb! : 1

Rattenembryo - früher Tag 15

Querschnitt durch den Kopf, Gaumenfalten noch hängend,
Zunge interponiert.

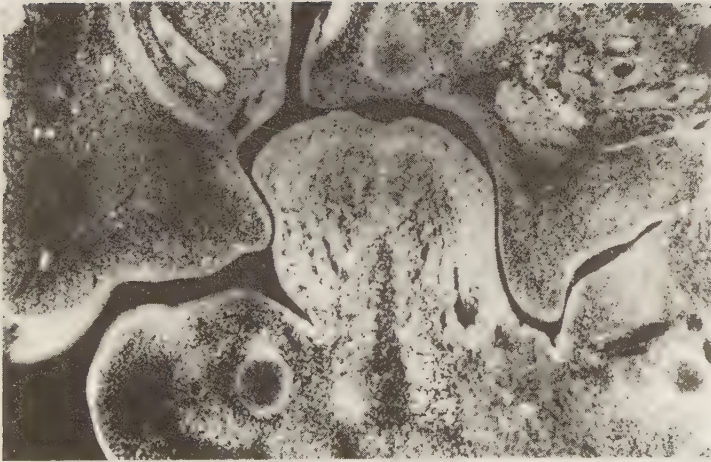


Abb.: 2

Rattenembryo – Tag 16

Querschnitt durch den Kopf, einseitiger Beginn
der Faltenaufrichtung.



Abb.: 3

Rattenembryo - später Tag 17

Querschnitt durch den Kopf, vollendeter Gaumenschluß, Verschmelzung der Gaumenfalten mit dem Nasenseptum.

das Aufrichten der Gaumenfalten, das dem Verschmelzungsprozess vorausgeht, werden unter anderem folgende Ursachen diskutiert:

Quellungsvorgänge in den Mukopolysacchariden der Gaumenfalten ermöglichen die Aufrichtung dieser processus.

Der Vorgang wird durch eine verstärkte Proliferation mit erhöhter Mitoserate eingeleitet.

Das Herabsinken der Zunge ermöglicht das Zusammenfinden der beiden Gaumenfalten.

Möglicherweise wird dieser komplizierte Vorgang durch das Zusammenspiel vieler derartiger Faktoren ermöglicht.

b. Störungen des Gaumenschlusses

Störungen des Gaumenschlusses können einmal auf genetischen Faktoren beruhen, zum anderen aber auch durch Pharmaka ausgelöst werden.

Untersuchungen an reinerbigen Mäusestämmen haben ergeben, daß die genetische Disposition eine große Rolle spielt. So zeigen verschiedene Mäuse-Inzuchtstämme eine sehr unterschiedliche spontane Mißbildungsrate an Gaumenspalten. Auch die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Pharmaka ist bei diesen einzelnen Mäusestämmen sehr verschieden. In der letzten Zeit haben jedoch daneben Untersuchungen aus verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, daß auch das Milieu des mütterlichen Uterus von Bedeutung ist (LARSSON 1971).

Besonders interessant sind für uns Störungen des Gaumenschlusses durch Pharmaka. Solche Störungen der Fetalentwicklung sind auch im Tierexperiment mit einer Vielzahl von Pharmaka



Abb.: 4

Aufsicht von der Mundhöhle her auf den bereits
geschlossenen Gaumen eines Rattenembryos am
Tag 20.



Abb.: 5

Ansicht der Gaumenspalte nach 6-AN-Behandlung
von der Mundhöhle her.

mit großer Sicherheit auszulösen. So führt bei Mäusen die Gabe von Glucocorticoiden (FRASER 1954 - KALTER 1954), von Antimetaboliten wie 6-Aminonicotinamid (CHAMBERLAIN 1963 1966), aber auch von Herbiciden wie 2,4,5-T (COURTNEY et al. 1970 - NEUBERT und DILLMANN 1972) und die Anwendung vieler anderer Substanzen zum Auftreten von Gaumenspalten. Der Mechanismus, durch den diese sehr verschiedenartigen Pharmaka mit dem Gaumenschluß interferieren, ist bis heute noch recht unklar. Die bisherigen Untersuchungen wurden ganz überwiegend mit morphologischen Methoden - meist makroskopisch - durchgeführt.

c. Fragestellung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Versuch gemacht werden, mit biochemischen Methoden einen Einblick in den Zellstoffwechsel des Gaumenfalten-Gewebes zu erhalten. In einem zweiten Abschnitt der Arbeit sollte dann der Einfluß einer teratogenen Substanz geprüft werden.

Wir beschlossen, entsprechende Untersuchungen über den Stoffwechsel der Gaumenfalten sowohl in-vitro als auch in-vivo durchzuführen. Um zunächst einen möglichst breiten Überblick über Stoffwechselfunktionen dieses fetalen Gewebes zu erhalten, wurde der Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in verschiedene Zellbestandteile untersucht. Diese Methode hat sich als "screening-Methode" bewährt (KROWKE et al. 1971). Die vervollständigung der benötigten Methodik gehörte ebenfalls zur Problematik dieser Arbeit. Ein weiterer Einblick in den Stoffwechsel sollte dann durch Untersuchungen mit ^3H -Thymidin gewonnen werden.

Als teratogenes Pharmakon sollte 6-Aminonicotinamid (6-AN) dienen, mit dem in unserer Arbeitsgruppe bereits reichlich Erfahrungen gewonnen werden konnten (KÖHLER et al. 1970):

NEUBERT et al. 1970 - BARRACH 1972).

Ein Teil der morphologischen Untersuchungen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Merker (Anatomisches Institut der FU) durchgeführt.

2. Methoden

=====

a. Versuchstiere

Für die Experimente wurden Ratten des Stammes Wistar SW 69 benutzt. Die Tiere erhielten Altromin-R. Sie hatten unbeschränkten Zugang zu Leitungswasser. Die Raumtemperatur betrug 25⁰, die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %.

Um Stoffwechseluntersuchungen am Tage 15 oder 16 durchführen zu können, ist es unerlässlich, das genaue Alter der Feten zu kennen. Die hormonale Steuerung der Ovulation erfolgt offenbar durch Licht. Da der Ovulationstermin durch Veränderung der Belichtung verschoben werden kann, wurden die Tiere bei verändertem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, um die Ovulation in die Arbeitszeit zu legen. Die Tiere hatten von 12.00 Uhr bis 4.00 Uhr - also 16 Stunden lang - Licht. Um 8.00 Uhr wurden die Tiere (drei Weibchen zu einem Männchen) für zwei Stunden zusammengesetzt. Durch Vaginal-Abstriche läßt sich dann feststellen, ob ein Coitus stattgefunden hat. Dadurch läßt sich der Konzeptionstermin genau festlegen.

Der Tag nach der Konzeption bis 9.00 Uhr des folgenden Tages wird als Tag 0 bezeichnet. Für eine genauere Bezeichnung haben wir zusätzlich zu der Anzahl der 24-Stunden-Periode die Zahl der Stunden angegeben (z.B. Tag 15 + 10 bedeutet: 15 volle Tage plus 10 Stunden nach der Paarung).

b. Präparation der Gaumenfalten

Zur Vorbereitung von in-vitro-Untersuchungen war es erforderlich, Gaumenfalten einzeln herauszupräparieren, um die Stoffwechseluntersuchungen im Gaumenfalten-Gewebe vornehmen zu können. Dazu wurden die Muttertiere am Tag 16 plus 0 dekapitiert und die Feten durch Kaiserschnitt entbunden. Mit einem Augenskalpell wurde dann der obere Teil des Kopfes durch einen Schnitt parallel zur Mund-Ohr-Linie abgetrennt. Unter dem Stereo-Mikroskop waren nur der primitive Gaumenfortsatz und die beiden herabhängenden Gaumenfalten deutlich zu erkennen. Durch zwei weitere Schnitte wurden die beiden Gaumenfalten abgetrennt und in eine modifizierte KREBS-RINGER-Lösung gelegt. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 140 mM NaCl - 4,9 mM KCl - 1,2 mM Na_2HPO_4 - 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5.

c. Einbaustudien mit ^{14}C -Glucose in-vitro

Bei den in-vitro-Untersuchungen wurden die Gaumenfalten verschiedene Zeiten in RINGER-Lösung mit Zusatz von ^{14}C -Glucose inkubiert. Nach Beendigung des Einbaues durch Perchlorsäure wurden die säurelöslichen Bestandteile durch mehrmaliges "Waschen" mit kalter Perchlorsäure entfernt und der Einbau in die verschiedenen säureunlöslichen Zellbestandteile untersucht. Gemessen wurde die Radioaktivität in den Lipiden, sulfatierten Glycosaminoglycanen, RNA, DNA und Proteinen.

d. Einbaustudien in-vivo

In Vorversuchen zur Entwicklung der Methodik wurden radioaktiv markierte Vorstufen injiziert, bei denen ein Einbau überwiegend in eine Zellkomponente erwartet werden konnte.



Abb.: 6 Rattenembryo - Tag 15 in Lupenvergrößerung



Abb.: 7

Querschnitt durch eine herauspräparierte
Gaumenfalte (ca. 20-fache Vergrößerung)

Benutzt wurde hierfür besonders ^{35}S , ^3H -Thymidin (^3H -Tdr) und ^{14}C -Phenylalanin.

Nach diesen Vorversuchen wurden die Untersuchungsserien dieser Arbeit so durchgeführt, daß die schwangeren Versuchstiere eine einmalige Applikation der radioaktiv marklierten Vorstufen intravenös erhielten und der Einbau in die Gaumenfalten verschiedene Zeiten nach der Injektion untersucht wurde. Als Vorstufen wurden Benutzt ^{14}C -Glucose und ^3H -Tdr.

e. Trennung säureunlöslicher Zellkomponenten mit einer modifizierten OGUR/ROSEN-SCHMIDT/TANNHAUSER-Methode

Als Routinemethode zur Fraktionierung der verschiedenen Zellbestandteile wurde eine "Säure-Laugen-Fraktionierung", d.h. eine modifizierte OGUR/ROSEN-SCHMIDT/TANNHAUSER-Methode benutzt.

Zur Auftrennung der verschiedenen Zellbestandteile wurde das Gewebe zunächst in einem Glashomogenisator mit Teflon mit kalter 4 %iger Perchlorsäure (PCS) homogenisiert. Durch mehrmaliges "Waschen" der Sedimente - d.h. Abzentrifugieren in einer Kühlzentrifuge und Resuspendieren - mit 2 %iger PCS wurden die säurelöslichen Bestandteile entfernt. Danach werden die Lipide durch dreimalige Extraktion mit Äther-Alkohol (3 + 1) sowie durch eine anschließende Extraktion mit Äther gewonnen.

In der schließlich adaptierten Methode wurde die RNA durch Inkubation mit RNase in Lösung gebracht und die verbliebenen Zellkomponenten durch nochmaliges Ansäuern mit 2 %iger PCS ausgefällt. Das Sediment wird in 0,3 n NaOH aufgenommen und anschließend bei 37° 60 Minuten inkubiert. Durch dieses Verfahren werden die sauren Glycosaminoglycane von ihren Proteinanteilen abgelöst und säurelöslich. Die nicht-säurelöslichen

Bestandteile werden wiederum durch Säure sedimentiert.

Im folgenden Schritt wird die DNA durch 15-minütiges Erhitzen bei 75° mit 5 %iger PCS hydrolysiert (2 x) und die Proteine mit Säure gefällt.

Die im Rückstand verbliebenen Proteine lassen sich dann in 10 %iger Natronlauge aufnehmen.

Die Radioaktivität in allen Zellfraktionen wurde mit einem liquid scintillation counter der Firma Packard - Tricarb 3380 - unter Benutzung einer externen Standardisierung gemessen.

Der DNA-Gehalt wurde in der DNA-Fraktion mit der BURTON-Methode (1956) bestimmt und die Radioaktivität aller Fraktionen auf diesen DNA-Gehalt bezogen.

Alle Versuchsergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Falls notwendig erfolgte eine Signifikanzberechnung nach dem t-Verfahren (PÄTAU, 1943).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit wiedergegebenen Untersuchungen können unterteilt werden einmal in Ergebnisse, die der Entwicklung einer geeigneten Methodik dienen und zum anderen in die Ergebnisse der eigentlichen Versuchsserien.

a. Fraktionierungsmethode zur Bestimmung des Einbaus radioaktiver Vorstufen in verschiedene Zellkomponenten

a) Trennung der RNA-Fraktion von sGG -----

Bei der Extraktionsmethode nach SCHMIDT/TANNHAUSER wird die RNA nach alkalischer Hydrolyse (0,3 n NaOH, 1 Stunde, 37°) gewonnen. Bei unseren Voruntersuchungen zeigte es sich jedoch, daß die in dieser Fraktion vorliegende RNA noch durch andere Komponenten, besonders durch sulfatierte Glycosaminoglycane, verunreinigt war.

Die in der Tabelle 1 wiedergegebenen Daten zeigen, daß nach Injektion von ³⁵S-Sulfat die radioaktive Markierung ganz überwiegend in der RNA-Fraktion (die auch die sulfatierten Glycosaminoglycane enthält) wiedergefunden wird. Aus den in dieser Tabelle wiedergegebenen Daten geht weiterhin hervor, daß eine relativ gute Linearität besteht zwischen der injizierten Dosis ³⁵S und der Einbaurrate.

Wir haben daher nach Methoden gesucht, diese Fraktion weiter aufzutrennen und möglichst reine RNA- beziehungsweise sGG-Fraktionen zu erhalten. Die in Tabelle 2 wiedergegebenen Ergebnisse umfangreicher Versuche zu diesem Problem zeigen, daß es möglich ist, die RNA durch eine Vorbehandlung mit RNase in Lösung zu bringen. Es zeigte sich, daß besonders die ribosomale RNA offenbar nur schwer von der RNase angegriffen wird (Tabelle 2). Aus den Ergebnissen der Versuche 1 - 10 geht hervor, daß etwa 30 % der RNA in der sGG-Fraktion wiedergefunden werden. Auf der anderen Seite erscheinen 10 - 25 % der ³⁵S-Radioaktivität in der RNA-Fraktion. Wie die Ergebnisse der Versuchsserien 11 - 14 zeigen, werden wesentlich bessere Versuchsergebnisse erhalten, wenn die Präparation vor beziehungsweise während der Einwirkung der RNase mehrfach gefroren und aufgetaut wird. Dieses Verfahren bricht offenbar die ribosomalen Strukturen auf, so daß die RNase auch die ribosomale RNA abbauen kann. In der günstigsten Versuchsserie (Serie 14) werden über 99 % der ³⁵S-Aktivität

Fraktion	dpm/ μ gDNA			
	Lipide	RNA+sGG	DNA	Proteine
1mCi/kg	0,83	13,75	2,08	0,48
^{35}S i.p.	$\pm 0,04$	$\pm 1,42$	$\pm 0,07$	$\pm 0,02$
2mCi/kg	1,58	27,33	3,83	0,82
^{35}S i.p.	$\pm 0,12$	$\pm 2,55$	$\pm 0,12$	$\pm 0,03$
3mCi/kg	2,28	43,37	6,01	1,12
^{35}S i.p.	$\pm 0,22$	$\pm 4,28$	$\pm 0,42$	$\pm 0,07$

Tab.: 1 Einbau von ^{35}S -Sulfat in verschiedene Zellfraktionen
16-Tage alter Rattenfeten in-vivo.

Verschiedene Dosen ^{35}S -Sulfat wurden den schwangeren Tieren 14 Stunden vor dem Versuch i.p. appliziert. Die Werte geben die Mittelwerte von 3 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung wieder. Es wurde der Einbau in die ganzen Feten bestimmt.

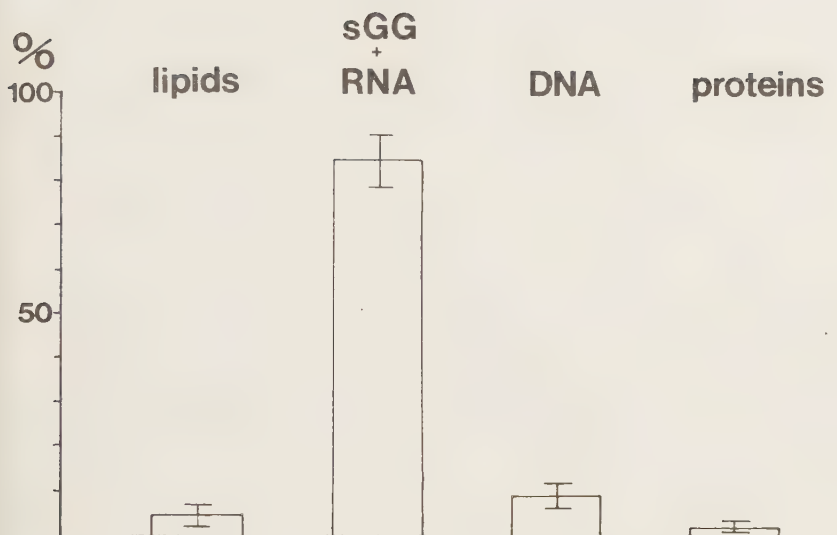


Abb.: 8

Prozentuale Verteilung des Einbaus von ^{35}S -Sulfat in verschiedene Zellfraktionen 16-Tage alter Rattenfeten in-vivo.

1mCi/kg ^{35}S -Sulfat wurde den schwangeren Tieren 14 Stunden vor dem Versuch (Tag 15+10) i.p. appliziert. Die Werte geben die Mittelwerte von 3 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung wieder. Es wurde der Einbau in die ganzen Feten bestimmt. 100% = 17 dpm/ μgDNA

Versuchsbedingungen sonst wie in Tab.: 1

Legende zu Tab.: 2

Einbau von ^{35}S -Sulfat in RNA und sulfatierte Glycosaminoglycane
von embryonalem Gewebe (Ratte Tag 16) in-vivo.

Verschiedene Arten der Fraktionierung wurden untersucht. Das beste Resultat wurde mit der Methode 14 erzielt. Diese Methode wurde für die weiteren Versuche benutzt.

Versuch	Temp.	RNase mg/ml	min	Puffer mM	pH	gefroren aufgetaut	RNase	NaOH	$\sum$ dpm	RNA	scG	in scG %
1	0	0,3	60	0,5% Triton 0,5 ml + 1 ml Tris	7,5	-	3379,1 25,0%	10132,2 75,0%	13511,3 100%	205,7	92,8	27,3
2	37	0,3	60	wie in Versuch 1	7,5	-	2845,7 19,5%	11749,0 80,5%	14584,7 100%	225,5	97,5	28,6
3	37	3,0	60	wie in Versuch 1	7,5	-	2456,0 17,0%	12012,4 83,0%	14468,4 100%	252,8	76,4	22,4
4	0	0,3	60	1,5ml Triton Suspension	-	-	2224,6 16,4%	11331,4 83,6%	13576,0 100%	255,2	74,3	21,8
5	37	0,3	60	1,5ml Triton Suspension	-	-	3819,2 29,9%	8521,1 70,1%	13340,3 100%	197,4	100,9	29,6
6	37	3,0	60	1,5ml Triton Suspension	-	-	3996,7 29,6%	9473,9 70,4%	13470,6 100%	194,7	104,7	30,7
7	0	0,3	60	Tris 1M	7,0	-	1837,2 17,9%	11156,5 82,1%	12993,7 100%	257,9	72,9	21,4
8	0	0,3	180	Tris 1M	7,0	-	1947,4 18,4%	10601,3 81,6%	12548,7 100%	246,8	78,1	22,9
9	0	0,3	60	Tris 1M	7,5	-	1046,4 8,8%	11934,2 91,2%	13180,6 100%	284,4	50,5	14,8
10	0	0,3	180	Tris 1M	7,5	-	1116,8 9,2%	12132,4 90,8%	13249,2 100%	280,3	53,2	15,6
11	0	0,3	60	Phosphat 0,5 mM	7,0	3x	517,1 4,0%	12928,1 96,0%	13445,2 100%	307,2	45,4	13,1
12	0	0,3	60	Phosphat 0,1 mM	7,0	3x	473,3 3,7%	12817,2 96,3%	13280,5 100%	309,2	44,7	13,1
13	0	0,3	60	Tris 1 mM	7,5	3x	285,9 2,2%	12998,3 97,8%	13284,2 100%	314,4	43,9	12,9
14	0	0,3	60	Tris 0,1 mM	7,5	3x	53,1 0,4%	13246,2 99,6%	13299,2 100%	317,7	42,6	12,5

in der sGG-Fraktion wiedergefunden. Hingegen enthält diese Fraktion nur etwa 12 % der Gesamt-RNA. Da die RNA in diesen Versuchen mit der ORZIN-Methode bestimmt wurde und Mukopolysaccharide ebenfalls in geringem Maße eine positive Reaktion geben, ist es wahrscheinlich, daß der Anteil der RNA in dieser Fraktion noch wesentlich niedriger ist. Diese Ansicht wird durch Experimente mit Orotsäure, die nach einem Einbau zu fast 100 % in der RNase-Fraktion wiedergefunden wird, (KROWKE et al. 1971), bestätigt.

Diese Untersuchungen zeigen, daß eine weitgehende Trennung von RNA und sulfatierten Glycosaminoglycanen mit der von uns entwickelten Methode möglich ist.

ß) Einbau verschiedener Vorstufen in Zellbestandteile von

Rattenembryonen.

Die Vollständigkeit der Trennung in bestimmte Zellbestandteile wurde weiterhin in der Weise untersucht, daß schwangeren Versuchstieren (Ratten) relativ "spezifische" Vorstufen injiziert wurden, von denen zu erwarten war, daß sie nur in eine Zell-Fraktion eingebaut würden. Die in Tabelle 3 und Abbildung 9 wiedergegebenen Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß ^3H -Thymidin zu etwa 90 % in der DNA-Fraktion wiedergefunden wird. Auch die DNA-Fraktion kann nach diesen Untersuchungen relativ rein gewonnen werden.

Schwieriger sind die Versuche mit ^{14}C -Phenylalanin zu interpretieren. Nach Gabe dieser Vorstufe wird ein nicht unerheblicher Teil der Radioaktivität in der Lipid-Fraktion, der sGG-Fraktion sowie in der DNA-Fraktion wiedergefunden. Phenylalanin ist allerdings keine ganz "spezifische" Vorstufe für die Protein-Fraktion. Es ist durchaus möglich, daß

dpm/ μ gDNA										
Fraktionen	1.ÄÄ	2.ÄÄ	3.ÄÄ	RNA	wash	sgg	wash	DNA	wash	proteine
Thymidin ^3H 1mCi/kg	0,21 $\pm$ 0,04	0,083 $\pm$ 0,006	0,068 $\pm$ 0,006	0,10 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	8,37 $\pm$ 0,63	0,17 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,03
Phenylalanin ^{14}C 125 μ Ci/kg	5,97 $\pm$ 0,22	0,96 $\pm$ 0,23	0,47 $\pm$ 0,13	0,42 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,02	4,47 $\pm$ 0,26	0,38 $\pm$ 0,07	4,33 $\pm$ 0,96	0,14 $\pm$ 0,06	38,97 $\pm$ 3,22
Sulfat ^{35}S 1mCi/kg	0,08 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	8,77 $\pm$ 1,14	0,76 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,02
Glucose ^{14}C 1mCi/kg	18,08 $\pm$ 1,13	2,62 $\pm$ 0,38	0,57 $\pm$ 0,05	5,85 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,05	3,68 $\pm$ 0,27	0,27 $\pm$ 0,03	6,57 $\pm$ 0,82	0,62 $\pm$ 0,09	11,67 $\pm$ 1,01

Tab.: 3 Einbau von ^3H -Tdr, ^{14}C -Phe, ^{35}S -Sulfat und ^{14}C -Glucose in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten von 16-Tage alten Rattenfeteten.

Die radioaktiv-markierten Substanzen wurden 14 Stunden vor dem Versuch i.p. appliziert. Die Werte geben die Mittelwerte von 3 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung wieder.

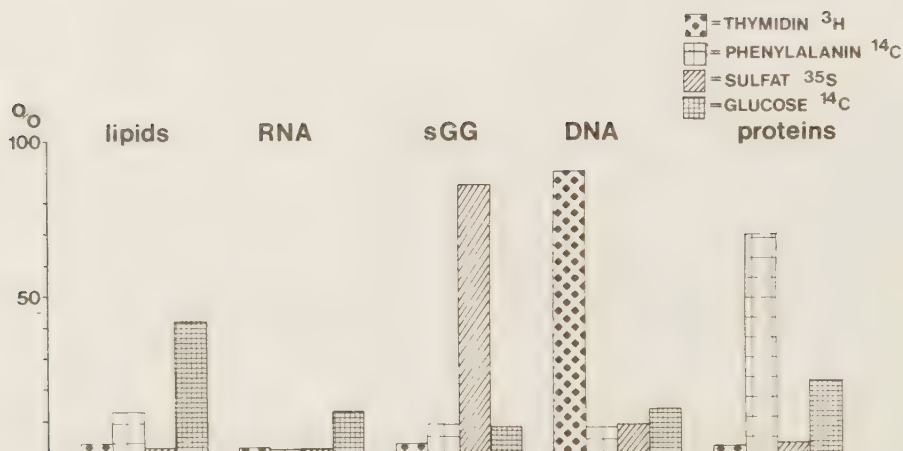


Abb.: 9

Prozentuale Verteilung des Einbaus von ^3H -Thymidin, ^{14}C -Phenylalanin, ^{35}S -Sulfat und ^{14}C -Glucose in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten 16-Tage alter Rattenfeteten.

Die radioaktiv-markierten Substanzen wurden den schwangeren Tieren 14 Stunden vor dem Versuch i.p. appliziert. Die Brauchbarkeit der benutzten Fraktionierungsmethode wurde mit den relativ "spezifischen" Präkursoren bestimmt. Prozentuale Auswertung der Daten aus Tab.: 3

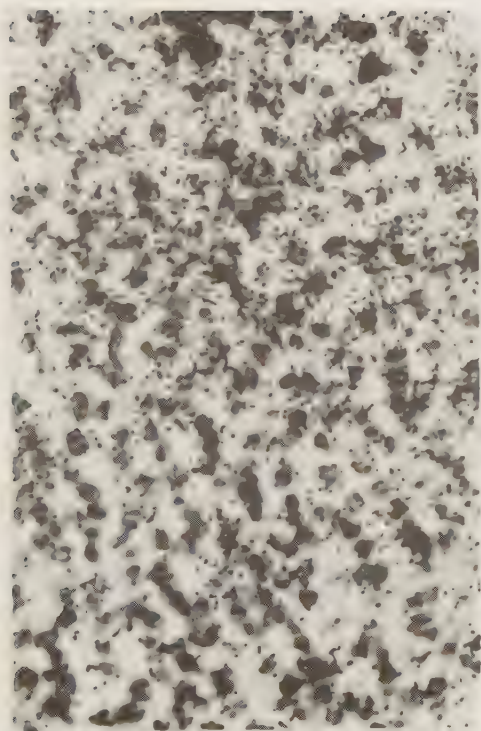


Abb.: 13 Autoradiographie mit ^{14}C -Glucose

Diffuse Verteilung der Aktivität

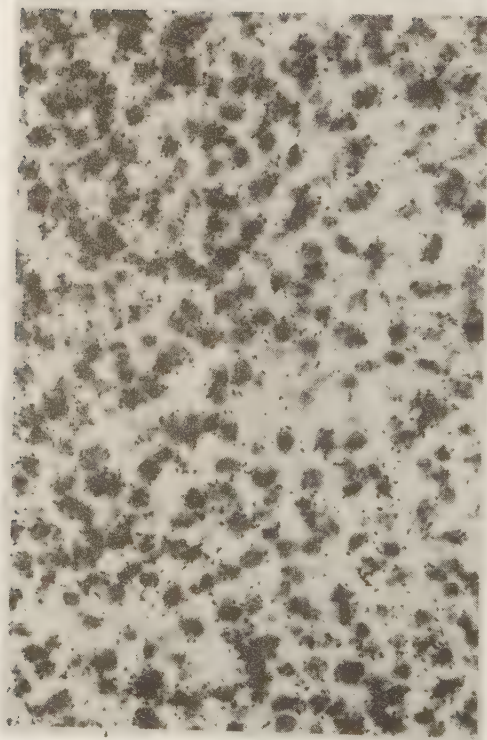


Abb.: 14

Autoradiographie mit ^{14}C -Phenylalanin

Markierung vorwiegend über den Zellen des Mesenchyms.

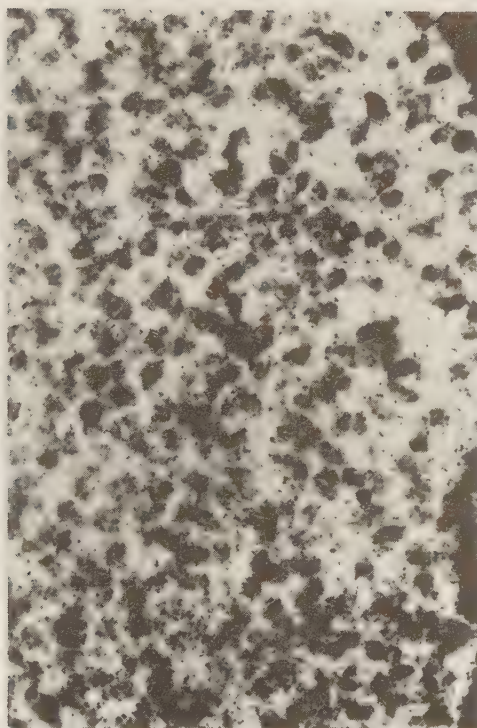


Abb.: 15

Autoradiographie mit ^{35}S -Sulfat

Aktivität über den Zellen und im extrazellulärem Raum.

Die mikroskopischen Aufnahmen und die Autoradiographien einschließlich der Fixierung wurden unter der Leitung von Herrn Professor MERKER durchgeführt. Ihm sei an dieser Stelle herzlichst gedankt.

die gefundene Radioaktivität in der Lipid-Fraktion Lipoproteide repräsentiert. Weiterhin wird die Fraktion der sulfatierten Glycosaminoglycane erst nach Abspaltung der entsprechenden Protein-Komponenten säurelöslich. Die betreffenden Protein-Komponenten könnten daher bei unserem Verfahren durchaus in dieser Fraktion verbleiben, wenn die Proteine säurelöslich sind.

Immerhin werden unter unseren Versuchsbedingungen rund 70 % der Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C -Phenylalanin in der Protein-Fraktion wiedergefunden.

In der Abbildung 9 sind auch erste Ergebnisse von Versuchen dargestellt, in denen die "unspezifische" Vorstufe ^{14}C -Glucose benutzt wurde. Man kann erkennen, daß Teile dieser Vorstufe in allen Fraktionen wiedergefunden werden. Der Anteil schwankt zwischen etwa 10 % in der sGG-Fraktion und etwa 40 % in der Lipid-Fraktion. Diese Vorstufe ist also durchaus geeignet, einen schnellen Überblick über Stoffwechsel-Reaktionen zu erhalten, die zur Synthese von Lipiden, RNA, sulfatierten Glycosaminoglycanen, DNA und Proteinen führen.

Die mit unserer Methode gewonnene DNA-Fraktion enthält noch in geringerem Maße Kohlenhydrat-Komponenten. Wir haben mehrere größere Versuchsserien durchgeführt, um auch eine Aufschlüsselung in diese beiden Komponenten zu erreichen. Der Versuch, die DNA - entsprechend dem Vorgehen bei der RNA - mit Hilfe von DNase in Lösung zu bringen, war jedoch nicht erfolgreich. Es gelang jeweils nur, einen relativ kleinen Teil in säurelösliche Form zu überführen. Wir haben daher in weiteren Versuchen darauf verzichtet, die in der DNA-Fraktion noch vorhandenen Kohlenhydrat-Komponenten vollständig abzutrennen. Die Einbaudaten mit ^{14}C -Glucose werden hierdurch nur unwesentlich verfälscht.

b. Untersuchungen über den Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in-vitro

In weiteren Serien von Experimenten haben wir versucht, Stoffwechselleistungen isolierter Gaumenfalten in-vitro zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden Isolierte Gaumenfalten in-vitro in einem Salz-Medium mit Zusatz radioaktiver Vorstufen inkubiert und der Einbau in verschiedenen Zellkomponenten gemessen. Als radioaktiv markierte Vorstufe wurde vorwiegend ^{14}C -Glucose benutzt.

Aus den in Abbildung 10 zusammengestellten Daten ist ersichtlich, daß ein linearer Einbau in die säureunlöslichen Zellkomponenten der Gaumenfalten in-vitro 60 Minuten lang durchgeführt werden kann. Die in-vitro Methode hat den Vorteil, daß bei einem genügend hohen Angebot von Radioaktivität relativ hohe Einbauraten erhalten werden können. Damit wird es möglich, auch genaue Messungen bei Zellkomponenten durchzuführen, die mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Prozentuale Verteilung der Einbaus von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten geht aus Abbildung 11 hervor. Für einen derartigen in-vitro-Versuch werden sechs Gaumenfalten pro Versuchsansatz benötigt. Die Ergebnisse zeigen, daß bei einem Einsatz von $25 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Glucose nach 15 Minuten Inkubation ein ausreichender Einbau vorliegt. Bei diesen Versuchen fällt auf, daß der Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen in die Lipide etwa dreimal so hoch ist wie der Einbau in die anderen Zellkomponenten. RNA, sulfatierte Glycosaminoglycane, DNA und Proteine unterscheiden sich nur unwesentlich in der Einbaurate.

Die in-vitro-Methode ist also durchaus geeignet, einen Einblick in die Stoffwechselleistungen des Gaumenfalten-Gewebes zu erhalten.

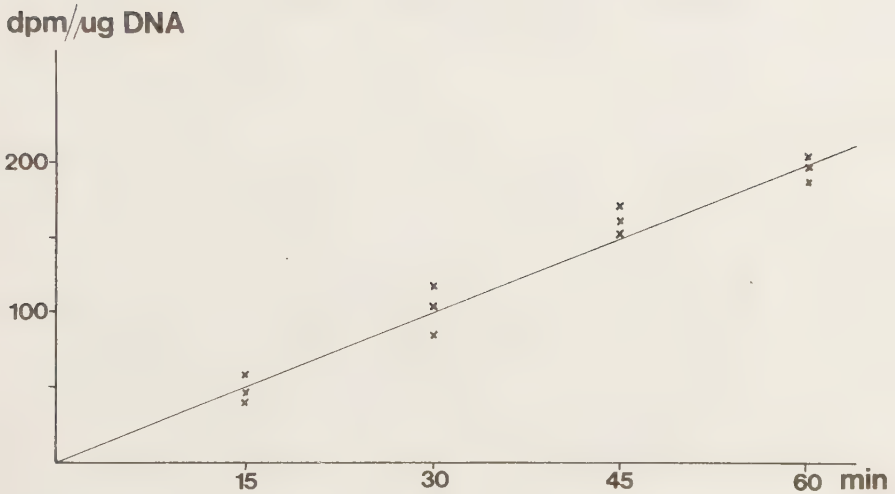


Abb.: 10

Einbau von ^{14}C -Glucose in die Gaumenfalten 16-Tage
alter Rattenfeten in-vitro.

Je 6 Gaumenfalten wurden in Ringerlösung bei 37° mit $25\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Glucose 15, 30, 45 und 60 min inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion mit 0,2 n Perchlorsäure wurde der Einbau in die säureunlöslichen Zellkomponenten bestimmt.

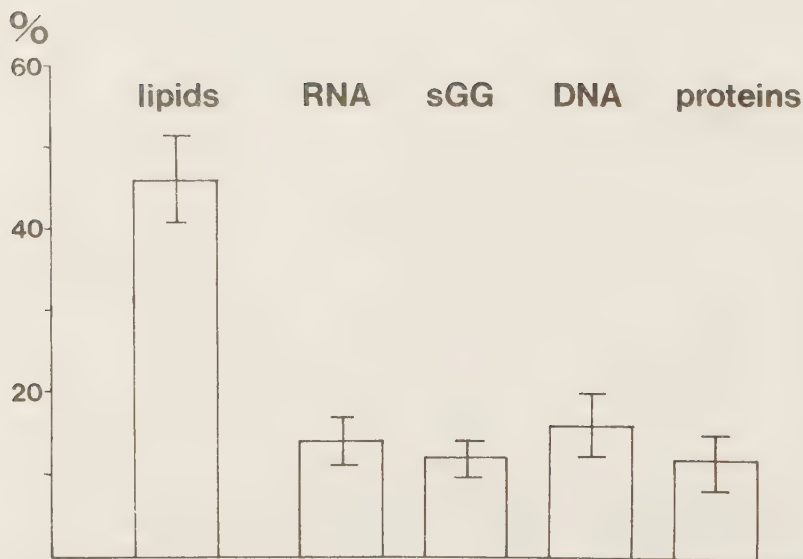


Abb.: 11

Prozentuale Verteilung des Einbaus von ^{14}C -Glucose in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten 16-Tage alter Rattenfeten in-vitro.

Je 6 Gaumenfalten wurden 15 min im Ringerlösung bei 37° mit $25\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Glucose inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion mit $0,2\text{ n}$ Perchlorsäure wurde der Einbau in die säureunlöslichen Zellkomponenten bestimmt.

$100\% = 50\text{ dpm}/\mu\text{gDNA}$

c. Untersuchungen über den Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in-vivo

Bei experimentellen Untersuchungen ist es häufig bedeutsam, auch einen Einblick in die Stoffwechselverhältnisse zu erhalten, die in-vivo vorliegen. Solche Untersuchungen sind mit dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten "screening-System" (KROWKE et al. 1971) möglich.

Wir haben daher versucht, ob es möglich ist, auch am Gaumenfalten-Gewebe in-vivo Stoffwechseluntersuchungen durchzuführen. Diese Untersuchungen wurden mit schwangeren Ratten am Tag 16 der Trächtigkeit durchgeführt. ^{14}C -Glucose wurde in einer Dosis von 1 mCi/kg injiziert und die Radioaktivität in den verschiedenen Zellbestandteilen 14 Stunden später untersucht. Die in Abbildung 12 zusammengestellten Daten zeigen, daß auch in-vivo ein ausreichender Einbau stattfindet, um verlässliche Meßwerte zu erhalten. Auch hier findet sich die höchste Einbaurate wieder - wie bei den in-vitro-Versuchen - in den Lipiden. Allerdings sind - im Gegensatz zu den in-vitro-Versuchen - auch die Proteine relativ hoch markiert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserien zeigen, daß es möglich ist, auch in den relativ kleinen Gewebemengen, die in den Gaumenfalten zur Verfügung stehen, Stoffwechseluntersuchungen in-vivo durchzuführen, wenn der Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten als Kriterium benutzt wird. Bei der hier verwendeten Einbauzeit von 14 Stunden kann allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden, daß auch Metaboliten der Glucose, die im Muttertier entstanden sind, eingebaut wurden. Da nach Untersuchungen von KROWKE et al. (1971) die Radioaktivität im mütterlichen Serum verhältnismäßig schnell absinkt, ist zu erwarten, daß der Haupteinbau in den ersten Stunden nach der Injektion erfolgt ist. Bei Erhöhung der injizierten Menge der radioaktiven Vorstufe - zum Beispiel auf 3 mCi/kg - sollte es möglich sein, derartige in-vivo-Untersuchungen zum Beispiel auch eine Stunde nach der Injektion durchzuführen.

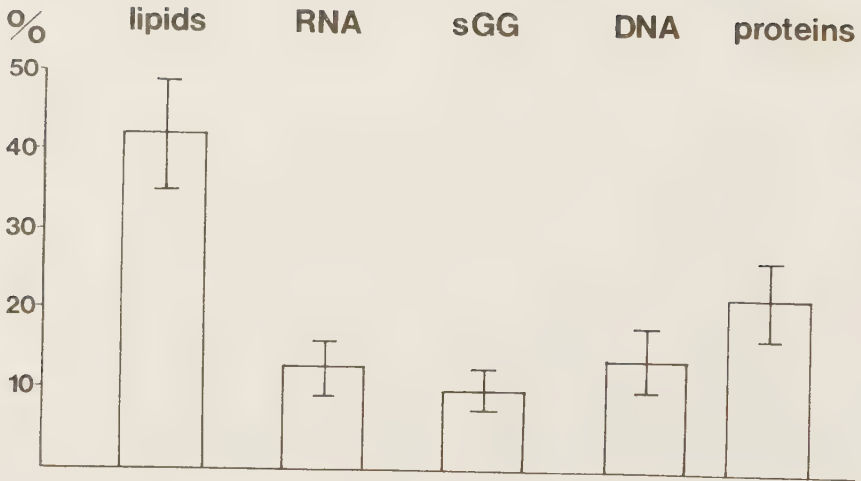


Abb.: 12

Prozentuale Verteilung des Einbaus von ^{14}C -Glucose in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten 16-Tage alter Rattenfeteten in-vivo.

1mCi/kg ^{14}C -Glucose wurde 14 Stunden vor dem Versuch den schwangeren Tieren i.p. appliziert. Die Werte geben die Mittelwerte von 4 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung wieder.

100% = 56 dpm/ugDNA

Die Methode scheint geeignet zu sein, Anhaltspunkte über den Stoffwechsel von Gaumenfalten unter dem Einfluß von Pharmaka zu erhalten.

d. Untersuchungen über den Einbau von ^3H -Thymidin in-vivo

Untersuchungen über den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Komponenten embryonalen Gewebes sind dadurch kompliziert, daß nur eine ungenaue Information über den Durchtritt dieser Substanzen durch die Placentarbarriere vorliegt. Wenn die Durchlässigkeit der Placentarschranke die Limitation darstellt, ist die Einbaurrate kein Maß für die Stoffwechselintensität im embryonalen Gewebe. Wir haben daher versucht, eine Methode zu finden, mit der diese Schwierigkeiten und diese Unsicherheit umgangen werden können.

Zu diesem Zwecke wurde folgendes Vorgehen gewählt: Die DNA im embryonalen Gewebe - in unserem Fall in den Gaumenfalten - wurde durch Gabe von ^3H -Thymidin radioaktiv markiert. Unter den eben erwähnten Voraussetzungen muß diese Markierungsrate kein Maß für die Stoffwechselintensität darstellen. Da im Falle der DNA die radioaktive Markierung aber über die ganze "Lebenszeit" der DNA erhalten bleibt, ist es möglich, die Rate der DNA-Synthese durch Messung der spezifischen Aktivität in der DNA zu verfolgen. Der Abfall in der spezifischen Aktivität der DNA - hervorgerufen durch die "Verdünnung" durch neugebildete, nicht radioaktiv markierte DNA - ist ein Maß für die DNA-Synthese in der Zeiteinheit.

Die in der Abbildung 9 und in der Tabelle 2 wiedergegebenen Resultate zeigen, daß nach Gabe von 1 mCi/kg ^3H -Tdr i.p. eine ausreichende Markierung in den Gaumenfalten erreicht wird, um solche Bestimmungen durchzuführen.

e. Untersuchungen über den Stoffwechsel von Gaumenfalten
nach Einwirkung von 6-Aminonicotinamid

In weiteren Versuchsserien wurde der Versuch gemacht, die Wirkungsweise von 6-Aminonicotinamid auf den Gaumenschluß aufzuklären. Dieser Antimetabolit führt bei Ratten und Mäusen bei einer geeigneten Dosierung zum Auftreten von Gaumenspalten in nahezu 100 % (CHAMBERLAIN 1966 - MERKER 1970).

Zwei Arten von Versuchen wurden durchgeführt:

α. Schwangere Ratten wurden mit 6-Aminonicotinamid behandelt, die Gaumenspalten nach einiger Zeit isoliert und die Stoffwechselleistungen dieses Gewebes in-vitro durch Inkubation mit ^{14}C -Glucose gemessen.

β. ^3H -Thymin wurde in die DNA der Gaumenfalten in-vivo eingebaut und der Abfall der spezifischen Radioaktivität, wie im Abschnitt d. gemessen. 6-Aminonicotinamid wurde in diesem Falle mehrere Stunden nach Gabe des radioaktiv markierten Thymins appliziert.

α. Versuche über den Einbau von ^{14}C -Glucose in-vitro nach

Gabe von 6-AN in-vivo

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in der Tabelle 4 und der Abbildung 16 zusammengestellt. Untersucht wurde der Stoffwechsel der Gaumenfalten 10 Stunden beziehungsweise 24 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten.

10 Stunden nach Gabe von 6-AN ist der Einbau von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in praktisch alle Zellbestandteile vermindert. Bei der geschilderten Versuchsanordnung wird eine Veränderung

Fraktion	dpm/ μ gDNA				
	Lipide	RNA	sGG	DNA	Proteine
Kontrolle 10 h	41,5	10,9	12,42	14,72	22,72
	35,0	12,9	9,54	15,54	24,81
	35,8	14,5	8,71	17,27	25,78
	40,3	9,6	8,22	16,81	23,22
$\bar{M}$ + SD	38,15 3,23	11,98 2,16	9,72 1,88	16,01 1,17	24,13 1,41
6-AN 10 h	23,24	5,29	9,78	11,32	17,09
	20,05	6,44	7,62	12,31	18,41
	19,61	7,42	7,08	13,32	20,01
	23,45	4,62	6,35	12,82	17,83
$\bar{M}$ + SD	21,59 3,04	5,94 1,24	7,71 1,48	12,45 0,86	18,34 1,24
Kontrolle 24 h	43,44	11,72	11,48	15,81	24,31
	37,21	9,82	14,21	16,72	26,29
	38,46	13,45	11,72	19,51	27,71
	44,72	14,11	13,27	17,47	26,92
$\bar{M}$ + SD	40,96 3,68	12,28 1,92	12,66 1,29	17,38 1,58	26,31 1,45
6-AN 24 h	33,45	8,74	12,63	15,15	22,84
	28,80	7,39	15,35	16,05	24,45
	30,04	10,09	12,77	18,50	26,06
	34,17	10,47	14,54	16,77	24,98
$\bar{M}$ + SD	31,62 2,60	9,17 1,41	13,82 1,34	16,62 1,42	24,58 1,34

Tab.: 4 Einbau von ^{14}C -Glucose in-vitro in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten von 16 Tage alten Rattenfeten nach Gabe von 6-Amino-Nicotinamid in-vivo.

Die Gaumenfalten wurden 30 min bei 37°C in Ringerlösung mit $25\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -u-Glucose inkubiert. Die Bestimmungen erfolgten 10 bzw. 24 Stunden nach Gabe von 8mg/kg 6-AN.

sGG= sulfatierte Glycosaminoglycane

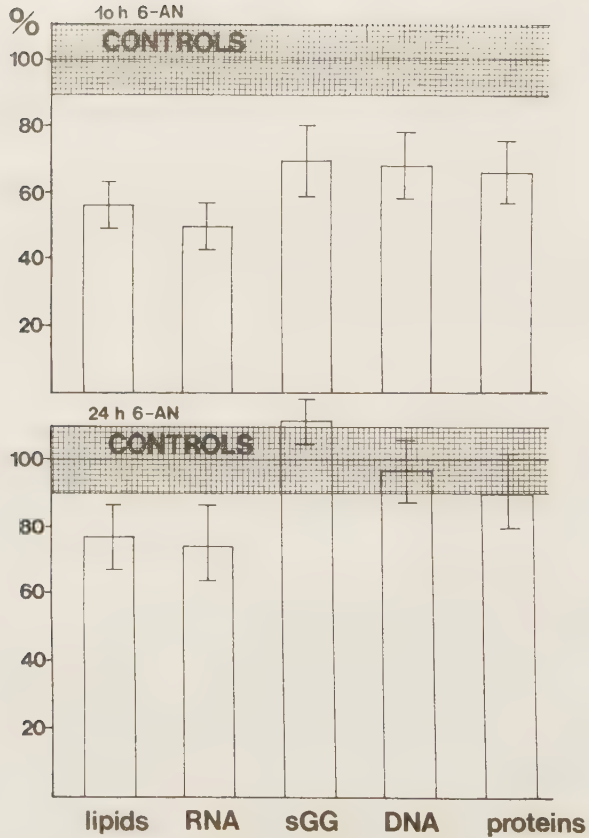


Abb.: 16

Einbau von ¹⁴C-Glucose in verschiedene Zellfraktionen der Gaumenfalten 16-Tage alter Rattenfeten nach Gabe von 6-AN

Nach Vorbehandlung durch Gabe von 8 mg/kg 6-AN 10 bzw. 24 Stunden vor dem Versuch wurden die Gaumenfalten herauspräpariert und in-vitro 30 min bei 37° in Ringerlösung mit 25 µCi/ml ¹⁴C-Glucose inkubiert. Der Einbau in die Gaumenfalten von (nicht behandelten) Kontrolltieren wurde 100% gesetzt. Auswertung der Daten aus Tab.:4

der Permeabilität der Glucose sowie eine Veränderung des Glucose-Stoffwechsels im mütterlichen Organismus - wie er nach 6-AN auftreten kann - vermieden. Besonders ausgeprägt ist die Verminderung des Einbaus von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in die Lipid-Fraktion und in die RNA-Fraktion.

24 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten haben sich einige dieser Stoffwechselveränderungen wieder normalisiert. So ist, verglichen mit den Kontrollen, keine Verminderung des Einbaus mehr bei sulfatierten Glycosaminoglycanen und bei DNA zu erkennen. Der Einbau in die Protein-Fraktion ist an der unteren Grenze der Norm. Auffallenderweise ist jedoch der Stoffwechsel von Lipiden und von RNA zum gleichen Zeitpunkt noch deutlich vermindert.

Diese Untersuchungen - besonders die Daten 24 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten - ergeben keinen Anhalt dafür, daß eine besonders ausgeprägte Beeinflussung des Stoffwechsels von sulfatierten Glycosaminoglycanen resultiert. Veränderungen im Stoffwechsel dieser Mukopolysaccharide wurden in ursächlichen Zusammenhang mit dem Phänomen der Aufrichtung der Gaumenfalten gebracht. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen könnten eher dafür sprechen, daß es nach Gabe des Antimetaboliten 6-Aminonicotinamid zu einer Beeinflussung des Lipid-Stoffwechsels oder der RNA-Synthese kommt.

ß. Einfluß von 6-AN auf die DNA-Synthese in den Gaumen- ----- falten in-vivo -----

Weitere Versuchsserien sollten uns Auskunft über die Frage geben, ob die Proliferationsrate in den Gaumenfalten unter dem Einfluß von 6-AN vermindert ist. Die Ergebnisse dieser Experimente, in denen die spezifische Aktivität in der DNA

gemessen wurde, sind in der Tabelle 5 und der Abbildung 18 wiedergegeben. Das Versuchsschema geht aus der Abbildung 17 hervor.

Man kann erkennen, daß in der untersuchten Zeit der Fetalentwicklung (Tag 14 - 16) eine erhebliche Synthese von DNA stattfindet. Innerhalb einer 24-Stunden-Periode - 10.00 Uhr am Tag 15 bis 10.00 Uhr am Tag 16 - wird der DNA-Gehalt, gemessen an der Veränderung der spezifischen Radioaktivität, mehr als verdoppelt.

Durch Gabe des Antimetaboliten 6-Aminonicotinamid wird diese Rate der DNA-Synthese wesentlich herabgesetzt. In den ersten 10 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten ist die DNA-Synthese mindestens um 50 % herabgesetzt. Am zweiten Teil des Tages nimmt die Geschwindigkeit der DNA-Synthese dann wieder etwas zu.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen eindeutig, daß die Proliferationsrate in dem Gaumenfalten-Gewebe durch Gabe von 8 mg/kg 6-AN erheblich herabgesetzt werden kann.

Die Ergebnisse dieser letzten Versuchsserie passen durchaus zu den im Abschnitt a. wiedergegebenen Resultaten der Glucose-Einbaustudien, durch die lediglich eine "Momentaufnahme" erhalten wird. Auch in diesen Versuchen war nach 10 Stunden eine Hemmung des Einbaus von Glucose-Fragmenten in DNA erkennbar, die 24 Stunden nach Gabe des Antimetaboliten weitgehend ausgeglichen war. Nach Untersuchungen von KROWKE und BOCHERT werden die Glucose-Bruchstücke überwiegend in den Riboseteil des DNA-Moleküls eingebaut. Für diesen Einbau wird der Pentose-Phosphat-Weg benutzt, der als bevorzugter Angriffspunkt der 6-AN-Wirkung bekannt ist (KÖHLER et al. 1970).

Die Verhinderung des Gaumenschlusses unter der Einwirkung von 6-AN könnte so vorgestellt werden, daß sowohl die Proliferation des Gaumenfalten-Gewebes als auch unter Umständen be-

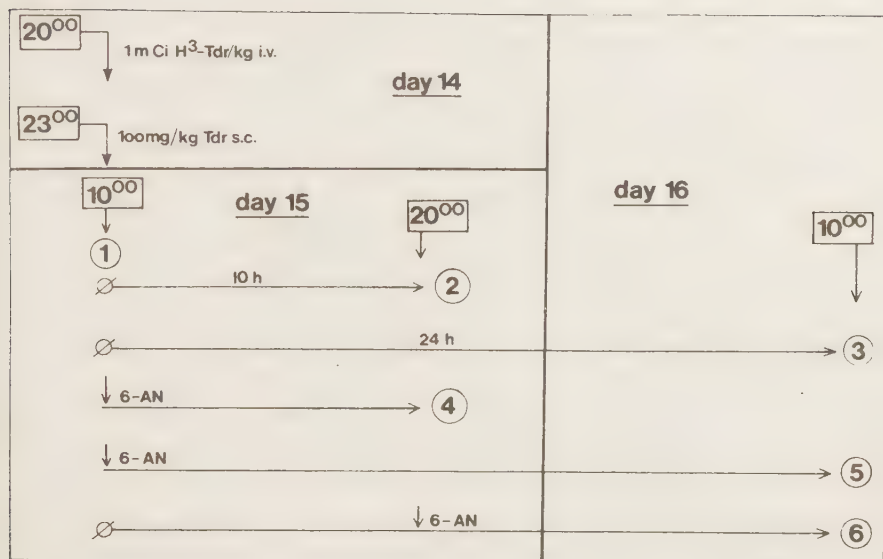


Abb.: 17

Versuchsanordnung der in Tab.: 5 bzw. in Abb.: 18 wieder-
gegebenen Daten

Schwangere Tiere erhielten am Tag 14 um 20 Uhr 1mCi/kg ³H-Thymidin i.v. und um 23 Uhr einen "chase" von nicht radioaktiv-markiertem Thymidin. (100 mg/kg s.c.)

Kontrolltiere (nicht behandelt) und Tiere nach Behandlung mit 8 mg/kg 6-AN (i.p.) wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Tdr-Gabe untersucht. DNA wurde nach dem Säure-Laugen-Verfahren extrahiert und die spezifische Aktivität bestimmt (dpm/ugDNA). Der Abfall der spezifischen Aktivität in der DNA gibt ein gutes Maß für das Ausmaß der DNA-Synthese.

Gruppe	dpm/ μ gDNA					
	1	2	3	4	5	6
a	344,1	282,8	148,6	307,9	314,9	250,2
b	409,2	325,0	205,9	364,9	328,1	227,4
c	372,8	294,5	165,5	374,2	341,3	248,0
d	410,4					
MW	395,0	300,8	172,3	379,0	328,1	237,2
$\pm$ Stand.-Abw.	21,1	24,2	30,7	17,0	13,2	11,2

Tab.: 5 Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Gaumenfalten 15 und 16 Tage alter Rattenfeten.

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 18 und siehe Schema Abb.:17
a-d= Mehrfachbestimmungen in der gleichen Versuchsgruppe.

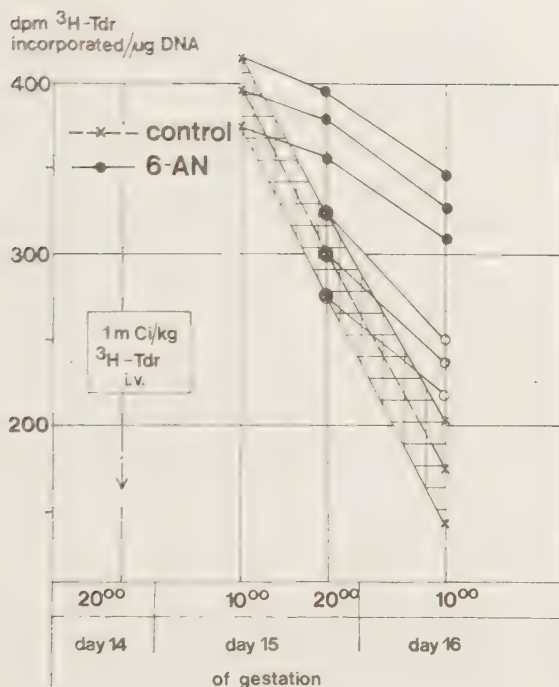


Abb.: 18

Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Gaumenfalten 15 und 16
Tage alter Rattenfeten in-vivo

1mCi/kg ^3H -Thymidin wurde in jedem Fall am Tag 14+10 i.v. appliziert. Gemessen wurde der Abfall der spezifischen Aktivität durch "Verdünnung" mit neugebildeter, nicht radioaktiv-markierter DNA!

6-AN wurde im Versuch 1 (—●—) um 10 Uhr, im Versuch 2 (—○—) um 20 Uhr i.p. appliziert. Eine Verminderung der DNA-Synthese ist deutlich erkennbar.

Siehe auch Abb.: 17 und Tab.: 5

stimmte induktive Vorgänge (Hemmung der RNA-Synthese !) gestört werden. Da es sich bei dem Gaumenschluß um einen Vorgang während der Fetalentwicklung handelt, der später offenbar nicht nachgeholt werden kann, kommt es zu einer echten Dissoziation in der Entwicklung der Gaumenfalten und im Wachstum der anderen Schädelknochen. Die Vereinigung der Gaumenfalten ist darum später nicht mehr möglich, und es resultiert eine echte, bleibende Mißbildung.

Die hier vorgelegten Resultate unserer Versuchsserien zeigen, daß eine Untersuchung des Problems des Gaumenschlusses mit biochemischen Methoden durchaus möglich ist. Die hier beschriebenen Methoden mögen daher auch geeignet sein, das Entstehen entsprechender Mißbildungen unter der Einwirkung anderer Pharmaka aufklären zu helfen.

4. Zusammenfassung

=====

1. Es wird eine Methode beschrieben, mit der es möglich ist, durch eine einfache Fraktionierung der Haupt-Zellbestandteile biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel des Gaumenfalten-Gewebes von Rattenfoeten durchzuführen. Gemessen wird der Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Lipide, RNA, sulfatierte Glycosaminoglycane, DNA und Proteine.
2. Stoffwechseluntersuchungen können an isolierten Gaumenfalten in-vitro durchgeführt werden, wenn das Gewebe mit radioaktiv markierten Vorstufen inkubiert wird und anschließend der Einbau in die entsprechenden Zellfraktionen gemessen wird. Der Einbau von Glucose in säureunlösliche Zellbestandteile verläuft bis zu 60 Minuten linear. ^{14}C -Glucose-Fragmente werden in alle untersuchten Zellbestandteile eingebaut.
3. Nach Applikation von ^{14}C -Glucose intravenös können Stoff-

wechseluntersuchungen auch in-vivo durchgeführt werden. Die in die Zellkomponenten der Gaumenfalten eingebaute Radioaktivität reicht für derartige Stoffwechselfmessungen aus. Auch bei diesen in-vivo-Untersuchungen werden alle gemessenen Zellbestandteile in ausreichender Weise radioaktiv markiert.

4. Mit Hilfe von ^3H -Thymidin ist es möglich, in-vivo Aussagen über die DNA-Synthese-Rate im Gaumenfalten-Gewebe zu machen. Durch Messung des Abfalles der spezifischen Aktivität in der DNA ist es möglich, komplizierende Faktoren wie die Permeabilität auszuschließen.

5. Nach Gabe von 6-AN an schwangere Versuchstiere wurde der Stoffwechsel der isolierten Gaumenfalten in-vitro gemessen. Nach einer anfänglichen Verminderung des Einbaues von ^{14}C -Glucose-Fragmenten in alle gemessenen Zellbestandteile kommt es zu einer Wiederherstellung mehrerer Stoffwechselwege, so daß 24 Stunden nach der Applikation nur ein verminderter Einbau in Lipide und in RNA nachweisbar ist.

6. Untersuchungen der Proliferationsrate in den Gaumenfalten 15 bis 16 Tage alter Rattenfeten mit Hilfe von ^3H -Thymidin zeigen, daß 6-AN die DNA-Synthese für mehrere Stunden weitgehend blockiert. 24 Stunden nach der Applikation des Antimetaboliten ist dieser Defekt jedoch - mindestens teilweise - wieder ausgeglichen. Der Effekt von 6-AN ist ausgeprägter, wenn der Antimetabolit am Beginn des Tages 15 appliziert wird gegenüber Resultaten, die erhoben werden, wenn die Versuchstiere in der Mitte des Tages 15 (um 20.00 Uhr) behandelt wurden. Dieses Resultat stimmt mit Ergebnissen teratologischer Untersuchungen überein, nach denen Gaumenspalten durch 6-AN am frühen Tag 15 mit großer Sicherheit und um den Beginn des Tages 16 herum nur noch in geringerem Maße ausgelöst werden können.

Die Anwendbarkeit der hier beschriebenen Methoden für bio-

chemische Untersuchungen der Vorgänge während des Gaumenschlusses wird diskutiert.

5. Literatur

- BARRACH, H.J., KÖHLER, E.: Biochemical Studies on the Embryo-toxic Action of 6-Aminonicotinamide
in: Naunyn Schmiedebergs Archiv exp. Path. und Pharmak., 260, 1968, p. 154
- BOCHERT, G. Eine Analyse der DNA-Synthese im embryonalen Säugetiergewebe unter dem Einfluß einiger embryotoxischer Pharmaka
in: Inaugural-Dissertation, FU Berlin 1971
- BURTON, K. A Study of conditions and mechanism of reaction for the colorimetric estimation of desoxiribonucleic acid
in: Biochem. J., 62, 1956, p. 315-323
- CHAMBERLAIN, J.G. Multiple Congenital Abnormalities in the Rat Resulting from Acute Maternal Niacin Deficiency During Pregnancy
in: Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 112, 1963, p. 836-840
- CHAMBERLAIN, J.G. Development of Cleft Palate induced by 6-Aminonicotinamide late in Rat Gestation
in: Anat. Rec. 156, 1966, p. 9-31
- CHAMBERLAIN, J.G. Effects of Acute Vitamin Replacement Therapy During 6-Aminonicotinamide Induced Cleft Palate Late in Rat Pregnancy
Presented at the 6th Annual Teratology Society Meeting
Corpus Christi, Texas May 1966 p. 25-28
- COURTNEY, K.D., GAYLOR, D.W., HOGAN, M.D., FALK, H.L., BATES, R.R. MITCHELL, J. Teratogenic Evolution of 2,4,5 T.
in: Science 168, 1970, p. 864-866
- FRASER, F.C., KALTER, H., WALKER, B.E., FAINSTADT, T.D. The Experimental Production of Cleft Palate with Cortisone and other Hormones
in: J. Cell. Comp. Physiol. 43 (Suppl. 1) 237-259 1954
- FRASER, F.C. The Genetics of Cleft Lips and Cleft Palate
in: The American J. of Human Genetics 22, 1970, 336

- KALTER, H. The Inheritance of Susceptibility to the Teratogenic Action of Cortisone in Mice
in: Genetics, 39, 1954, p. 185-196
- KALTER, H. Sporadic Congenital Malformations of Newborn Inbred Mice
in: Teratology 1, 1968, 193
- KÖHLER, E., BARRACH, H.J., NEUBERT, D. Inhibition of NADP dependent Oxiredutases by the 6-Aminonicotinamide analogue of NADP
in: FEBS-Letters 6, 1970, 225
- KROWKE, R. Untersuchungen über den Nuclein-Stoffwechsel im embryonalen Säugetiergewebe in-vivo und in-vitro
in: Inaugural-Dissertation FU-Berlin 1970
- KROWKE, R., SIEBERT, G., NEUBERT, D. In Symposium on " Metabolic Pathways in Mammilian Embryos During Organogenesis and its Modification by Drugs Berlin 1970
- KROWKE, R., PIELSTICKER, K., SIEBERT, G. A Simple Fractionation Procedure for Studying Incorporation of Radioactively Labelled Precursors into Mammilian Main Cell Components
in: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. 1971
- LARSSON, S.K., MARSH, L., THEORELL, M. Transfer of Blastocysts as applied in Experimental Teratology
in: Abschr. 2. Meeting Europ. Teratol. Soc. Cardiff Teratology 4 1971
- LARSSON, S.K. Closure of secondary palate and its relation to sulfo-mucopolysaccharides
in: Acta odontol. Scand. 20 Suppl. 31 1-35
- MERKER, H.J., NOVACK, L., ZIMMERMANN, B. Electron Microscopic Studies on the Effect of 6-Aminonicotinamide on Mammilian Embryos

in: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. 226, 1970 p. 401
- NEUBERT, D., MERKER, H.J. Variations in Drug Metabolism During Mammilian Development. Genetic Aspects
in: Humangenetik 9, 1970, 269
- NEUBERT, D., MERKER, H.J., KÖHLER, E., KROWKE, R., BARRACH, H.J. Biochemical Aspects of Teratology
in: adv. in the Biosciences 6, 1970, 575

- NEUBERT, D., DILLMANN, I. Embryotoxic Effects in Mice Treated with
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid and 2,3,7,8-Tetra-
chlorodibenzo-p-Dioxin
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1972 in press
- OGUR, M., ROSEN, R. The nucleic acid of plant tissue;
The extraction and estimation of desoxypentose nucleic
acid and pentose nucleic acid
in: Archiv Biochem. 25, 1950, p. 262
- PÄTAU, K. Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen
in: Biologisches Zentralblatt 63, 1943, p. 152-163
- SCHIMMELPFENNIG, K. Studies on Glycosaminoglycans in Mammalian
Embryonic Tissue
in: Symposium on "Metabolic Pathways in Mammalian
Embryos During Organogenesis and its Modification"
by Drugs Berlin 1970
- SCHIMMELPFENNIG, K. Problems Connected with in-vivo Labelling of
Embryonic Glycosaminoglycans with $\text{Na}^{35}\text{SO}_4$ in
Teratological Studies
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 271, 1971, 320
- SCHIMMELPFENNIG, K., BAUMANN, T., KAUFMANN, Ch. Studies on Glycosami-
noglycans (GAG) in Mammalian Embryonic Tissue
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 1972, 65
- SCHMIDT, G., TANNHAUSER, S.J. A Methode for the Determination of
Desoxyribonucleic Acid, Ribonucleic Acid and Phos-
phoproteins in Animal Tissue
in: J.B.C. 161, 1945, p. 83-89
- TURBOW, M.M., CHAMBERLAIN, J.G. Direct Effects of 6-Aminonicotin-
amide on the Developing Rat Embryo in-vitro and in-vivo
in: Teratology 1, 1968, p. 103-108
- WALKER, B.E., FRASER, F.C. Closure of the secondary palate in three
strain of mice
in: J. Embryol. exp. Morph. 4, 1956, p. 176-189

Ich danke Herrn Professor Dr. D Neubert für die Überlassung
des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Fertig-
stellung meiner Dissertation.

Konrad Pielsticker
1 Berlin 46
Charlottenstr. 7a

Lebenslauf

Geburtsdatum:	27. August 1943 in Kiel
Vater:	Dr. med. Gustav Pielsticker
Mutter:	Friedel, geb. Christiansen
Frühjahr 1946	Umzug von Kiel nach Versmold
1950-1954	Besuch der Volksschule in Versmold
1954-1965	Besuch des Gymnasiums in Gütersloh
Februar 1965	Abitur
April 1965-Oktober 1966	Polizeibeamter des Landes NRW
August 1966	Heirat
Oktober 1966-März 1969	Zahnmedizinstudium an der Universität Münster
April 1969	Umzug mit meiner Familie nach Berlin
April 1969 -Oktober 1971	Zahnmedizinstudium an der FU
Dezember 1971	Staatsexamen
Januar 1970-Januar 1972	Doktorant im Pharmakologischen Institut der FU-Berlin

DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216